

III. METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat

Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan Desember 2018 – Mei 2019. Tempat pelaksanaan penelitian di Laboratorium Kultur Jaringan Pusat Pengembangan Bioteknologi Universitas Muhammadiyah Malang di Jl. Raya Tlogomas No. 246 Malang 65144 Indonesia.

3.2. Alat dan Bahan

3.2.1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC), *air conditioner* (AC), autoklaf, timbangan digital, kertas lakmus, cawan petri, botol kultur, erlenmeyer, *beaker glass*, gelas ukur, bunsen, spatula, mortal martil, *scalpel and blade*, pinset, *microwave*, *sentrifuge*, spektrofotometer, inkubator, kompor gas, panci, *handsprayer*, pipet ukur, tube plastik, rak kultur, plastik, karet, gunting, kertas label, kertas amplop coklat, mistar, dan alat dokumentasi.

3.2.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah planlet kentang kultivar Granola Kembang, media MS (Murashige dan Skoog, 1962), pupuk daun Qiuwita, pemadat media agar, sukrosa, NaOH, HCl, zat pengatur tumbuh BAP, alkohol 96%, alkohol 70%, acetone 85%, aquades, dan spiritus.

3.3. Metode Penelitian

3.3.1. Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan 2 faktor. Faktor utama adalah konsentrasi media MS, terdiri dari empat taraf yaitu:

M0 = Konsentrasi komposisi media MS terukur

M1 = 3/4 komposisi media MS

M2 = 2/4 komposisi media MS

M3 = 1/4 komposisi media MS

Faktor kedua adalah konsentrasi pupuk daun, terdiri dari empat taraf yaitu:

Q0 = pupuk daun 0 g/l (kontrol).

Q1 = pupuk daun 1 g/l.

Q2 = pupuk daun 2 g/l.

Q3 = pupuk daun 3 g/l.

Kombinasi perlakuan berjumlah 16 diuji dalam 3 kali ulangan, setiap perlakuan terdiri 4 populasi botol dengan 3 sampel botol, secara keseluruhan yaitu 3x4x16 satuan percobaan (Tabel 2). Setiap satuan percobaan terdiri atas 5 eksplan.

Tabel 2. Kombinasi Perlakuan

Konsentrasi Media MS	Konsentrasi pupuk daun Qiuvita			
	Q0	Q1	Q2	Q3
M0	M0Q0	M0Q1	M0Q2	M0Q3
M1	M1Q0	M1Q1	M1Q2	M1Q3
M2	M2Q0	M2Q1	M2Q2	M2Q3
M3	M3Q0	M3Q1	M3Q2	M3Q3

Keterangan: M=Konsentrasi Media MS, Q=Konsentrasi pupuk daun

Denah percobaan ditunjukkan oleh Gambar 3. sedangkan Denah petak percobaan ulangan 1, 2, dan 3 ditunjukkan pada Gambar 4, 5, dan 6.

3.3.2. Denah Percobaan

Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III
M3Q1	M2Q2	M1Q0
M1Q1	M3Q0	M3Q0
M3Q3	M0Q1	M1Q2
M0Q3	M2Q1	M2Q0
M2Q2	M1Q3	M1Q3
M0Q0	M1Q1	M2Q2
M3Q0	M3Q1	M1Q1
M2Q3	M1Q0	M3Q2
M2Q1	M0Q3	M3Q3
M0Q1	M0Q2	M2Q3
M1Q2	M3Q3	M0Q3
M1Q0	M1Q2	M0Q2
M2Q0	M2Q3	M0Q1
M0Q2	M2Q0	M2Q1
M1Q3	M0Q0	M3Q1
M2Q3	M3Q2	M0Q0

Gambar 3. Denah percobaan

Keterangan:

M0Q0 = komposisi media MS + pupuk daun 0 g/l

M0Q1 = komposisi media MS + pupuk daun 1 g/l

M0Q2 = komposisi media MS + pupuk daun 2 g/l

M0Q3 = komposisi media MS + pupuk daun 3 g/l

M1Q0 = komposisi media 3/4 MS + pupuk daun 0 g/l

M1Q1 = komposisi media 3/4 MS + pupuk daun 1 g/l

M1Q2 = komposisi media 3/4 MS + pupuk daun 2 g/l

M1Q3 = komposisi media 3/4 MS + pupuk daun 3 g/l

M2Q0 = komposisi media 2/4 MS + pupuk daun 0 g/l

M2Q1 = komposisi media 2/4 MS + pupuk daun 1 g/l

M2Q2 = komposisi media 2/4 MS + pupuk daun 2 g/l

M2Q3 = komposisi media 2/4 MS + pupuk daun 3 g/l

M3Q0 = komposisi media 1/4 MS + pupuk daun 0 g/l

M3Q1 = komposisi media 1/4 MS + pupuk daun 1 g/l

M3Q2 = komposisi media 1/4 MS + pupuk daun 2 g/l

M3Q3 = komposisi media 1/4 MS + pupuk daun 3 g/l

Populasi dan Sampel Tanaman				
Kombinasi perlakuan	1	2	3	4
	1	M3Q1	M3Q1	M3Q1
	2	M1Q1	M1Q1	M1Q1
	3	M3Q3	M3Q3	M3Q3
	4	M0Q3	M0Q3	M0Q3
	5	M2Q2	M2Q2	M2Q2
	6	M0Q0	M0Q0	M0Q0
	7	M3Q0	M3Q0	M3Q0
	8	M2Q3	M2Q3	M2Q3
	9	M2Q1	M2Q1	M2Q1
	10	M0Q1	M0Q1	M0Q1
	11	M1Q2	M1Q2	M1Q2
	12	M1Q0	M1Q0	M1Q0
	13	M2Q0	M2Q0	M2Q0
	14	M0Q2	M0Q2	M0Q2
	15	M1Q3	M1Q3	M1Q3
	16	M2Q3	M2Q3	M2Q3

Gambar 4. Denah petak percobaan Ulangan 1

Populasi dan Sampel Tanaman				
Kombinasi perlakuan	1	2	3	4
	1	M2Q2	M2Q2	M2Q2
	2	M3Q0	M3Q0	M3Q0
	3	M0Q1	M0Q1	M0Q1
	4	M2Q1	M2Q1	M2Q1
	5	M1Q3	M1Q3	M1Q3
	6	M1Q1	M1Q1	M1Q1
	7	M3Q1	M3Q1	M3Q1
	8	M1Q0	M1Q0	M1Q0
	9	M0Q3	M0Q3	M0Q3
	10	M0Q2	M0Q2	M0Q2
	11	M3Q3	M3Q3	M3Q3
	12	M1Q2	M1Q2	M1Q2
	13	M2Q3	M2Q3	M2Q3
	14	M2Q0	M2Q0	M2Q0
	15	M0Q0	M0Q0	M0Q0
	16	M3Q2	M3Q2	M3Q2

Gambar 5. Denah petak percobaan Ulangan 2

Kombinasi perlakuan

Populasi dan Sampel Tanaman				
	1	2	3	4
1	M1Q0	M1Q0	M1Q0	M1Q0
2	M3Q0	M3Q0	M3Q0	M3Q0
3	M1Q2	M1Q2	M1Q2	M1Q2
4	M2Q0	M2Q0	M2Q0	M2Q0
5	M1Q3	M1Q3	M1Q3	M1Q3
6	M2Q2	M2Q2	M2Q2	M2Q2
7	M1Q1	M1Q1	M1Q1	M1Q1
8	M3Q2	M3Q2	M3Q2	M3Q2
9	M3Q3	M3Q3	M3Q3	M3Q3
10	M2Q3	M2Q3	M2Q3	M2Q3
11	M0Q3	M0Q3	M0Q3	M0Q3
12	M0Q2	M0Q2	M0Q2	M0Q2
13	M0Q1	M0Q1	M0Q1	M0Q1
14	M2Q1	M2Q1	M2Q1	M2Q1
15	M3Q1	M3Q1	M3Q1	M3Q1
16	M0Q0	M0Q0	M0Q0	M0Q0

Gambar 6. Denah petak percobaan Ulangan 3

3.4. Metode Analisis Data

Data kuantitatif yang diperoleh dianalisis dengan uji statistik ANOVA (*analysis of varians*), untuk mengetahui ada tidaknya interaksi antar faktor dan pengaruh masing-masing faktor. Data analisis ragam interaksi perlakuan atau analisis ragam terpisah perlakuan yang diperoleh memiliki beda nyata pada taraf uji 5% ($P \leq 0,05$) maka analisis dilanjutkan dengan menggunakan uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) untuk melihat perlakuan mana yang memberikan efek berbeda (Steel and Torrie, 1993 *dalam* Budaya dkk., 2015) selain itu uji DMRT lebih teliti dan bisa digunakan untuk membandingkan pengaruh perlakuan dengan jumlah perlakuan yang besar (Soenyoto, 2017). Analisis ragam dan uji lanjut menggunakan aplikasi Microsoft Excel. Penyajian data dengan menggunakan tabel.

3.5. Pelaksanaan

3.5.1. Persiapan

Pelaksanaan penelitian ini dilakukan sebelum kegiatan pelaksanaan inti penelitian, yang terdiri dari:

a. Persiapan bahan tanam

Bahan tanam kultur kentang berasal dari plantlet kentang varietas Granola Kembang berumur 2 bulan, bebas dari kontaminasi bakteri dan jamur yang ditanam pada medium MS hasil subkultur yang diperoleh dari Laboratorium Kultur Jaringan Universitas Muhammadiyah Malang.

b. Sterilisasi Alat

Alat-alat yang digunakan dicuci terlebih dahulu dengan deterjen, direndam 1x24 jam dengan larutan clorox, dan dikeringkan. Botol yang telah dikeringkan ditutup plastik pada mulut botolnya, cawan petri dan pipet ukur yang sudah dibungkus menggunakan kertas masing-masing dimasukkan ke plastik PP dan ditutup rapat direkatkan dengan karet gelang. Sterilisasi alat di dalam autoklaf pada suhu 121⁰C, tekanan 17.5 psi selama 60 menit. Alat-alat ditempatkan dalam ruangan bersih dan steril.

c. Pembuatan medium sub-kultur

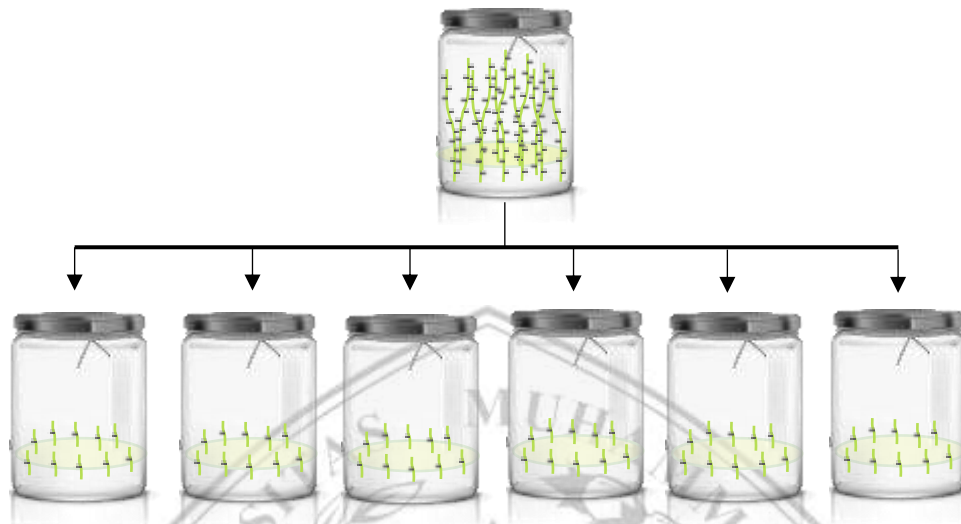
Medium yang digunakan adalah medium Murashige dan Skoog (MS) tanpa penambahan zat pengatur tumbuh (MS 0) sebanyak 1000 ml. Proses pembuatan media adalah sebagai berikut:

1. Menyiapkan dan mensterilisasi peralatan yang digunakan pembuatan media.
2. Membuat larutan stok media MS sesuai kebutuhan hara makro dan mikro.
3. Mempersiapkan stok media MS dan mengambil stok media dengan menggunakan pipet ukur ke dalam beker glass untuk pembuatan media MS.
4. Menimbang sukrosa sebanyak 30 g dan agar sebanyak 7 g.
5. Menambahkan sukrosa yang telah ditimbang sesuai dengan kebutuhan ke dalam media dan mengaduk media hingga homogen .
6. Mengatur pH media dan menambahkan NaOH tetes pertetes jika pH media terlalu asam dan menambahkan HCl jika pH terlalu basa sambil diaduk terus menerus agar larutan menjadi homogen dan tepat pengukuran pH-nya.
7. Menambahkan agar-agar yang telah ditimbang jika pH telah mencapai 5,6-5,8.
8. Memasak media menggunakan *microwave* hingga mendidih dan merata.
9. Memasukkan media ke dalam botol kultur yang telah disterilisasi dengan volume larutan 20 ml media per botol.
10. Menutup botol dengan plastik yang telah disterilisasi dan diikat dengan karet gelang.

d. Sub-kultur plantlet

Subkultur bahan tanam bertujuan untuk mendapatkan bahan tanam penelitian dalam jumlah yang banyak dan seragam. Sub-kultur menggunakan eksplan dari planlet kentang varietas Granola Kembang yang berisi 10 eksplan per botol. Bahan tanam penelitian diharapkan dapat disub-kultur pada planlet yang

berumur 1,5-2 bulan. Estimasi perbanyakan 4 botol planlet menghasilkan 1000-1500 eksplan siap tanam.



Gambar 7. Subkultur planlet kentang pada media MS

3.5.2. Pelaksanaan Penelitian

Pelaksanaan penelitian merupakan kegiatan inti yang terdapat perlakuan, yaitu:

a. Pembuatan medium perlakuan

Medium yang digunakan adalah medium Murashige dan Skoog (MS) yang ditambah zat pengatur tumbuh BAP dengan konsentrasi 5 ppm. Pembuatan stok medium perlakuan yaitu medium MS 0, 3/4 MS, 2/4 MS, dan 1/4 MS masing-masing sebanyak 1400 ml. Sukrosa yang telah ditimbang sebanyak 42 gr sejumlah empat kali ditambahkan pada masing-masing stok media MS 1400 ml. Menambahkan BAP 5 ppm atau setara dengan 0,777 ml per stok media MS. Aquadest ditambahkan hingga 1400 ml. Membagi stok media MS menjadi empat bagian masing-masing 350 ml. Mengukur keasaman media menggunakan kertas

lakmus pH hingga mencapai pH 5,8 dengan penambahan HCl 0,1 N atau NaOH 0,1 N. Menambahkan agar yang sudah ditimbang 16 kali sebanyak 2,45 g pada masing-masing 350 ml media MS. Memasak larutan yang ada dalam *beaker glass* pada *microwave* sambil diaduk hingga mendidih.

Memasukkan media ke dalam botol kultur (volume cairan 20 ml) serta menutupnya menggunakan plastik dan diikat dengan karet, serta diberi label perlakuan pada botol. Medium yang telah tersedia kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 10 menit dengan tekanan 17,5 psi. Media disimpan di ruang kultur pada suhu 25°C selama 3-7 hari apabila media tidak terjadi kontaminasi dapat ditanami dengan eksplan kentang secara aseptik.

b. Penanaman

Proses inokulasi dilakukan dengan kondisi yang aseptik. Inokulasi dilakukan selama 3 hari. Alat-alat diseksi dan media disiapkan di dalam *laminar air flow* dan disinari dengan ultra violet selama 60 menit. Setiap alat tersebut dicelupkan ke dalam alkohol 96% dan dilewatkan diatas nyala api bunsen setiap hendak melakukan inokulasi didalam LAF. Mengeluarkan planlet kentang dari dalam botol. Eksplan yang digunakan adalah bagian pucuk, tengah, dan bawah planlet. Planlet dipotong $\pm 1-2$ cm / satu buku kemudian membuka tutup botol kultur yang berisi media perlakuan dan mendekatkannya ke bunsen burner lalu menginokulasikan 5 eksplan dalam tiap botol kultur. Menutup kembali botol dengan plastik penutup dan mengikat dengan karet serta melapisinya dengan plastik wrapping botol untuk meminimalisir kontaminasi dan diberikan kode sesuai dengan perlakuan Kemudian di simpan di ruang kultur yang steril.

c. Pemeliharaan Kultur

Eksplan yang telah ditanam di dalam botol kultur disimpan dalam rak kultur. Suhu dalam ruang kultur berkisar 19-22°C. Botol-botol yang berisi eksplan tersebut disusun dengan rapi sehingga memudahkan dalam pengamatan. Untuk mengurangi tingkat kontaminasi, dilakukan penyemprotan di sekitar botol kultur dengan menggunakan alkohol 70% setiap seminggu sekali, serta mengurangi rutinitas keluar masuk ruang inkubasi. Pemeliharaan kultur dilakukan selama 6 minggu.

d. Pengamatan

Pengamatan pertumbuhan dilakukan satu minggu sekali selama 6 minggu setelah inokulasi untuk melihat pengaruh kombinasi media terhadap parameter pertumbuhan tanaman kentang secara morfologi yaitu terhadap waktu muncul tunas, tinggi planlet, jumlah daun planlet, jumlah ruas, jumlah umbi, dan jumlah akar. Pengamatan skoring ketegaran planlet dilakukan satu kali pada akhir pengamatan (42 HSI). Pengamatan destruktif dilakukan untuk mengetahui berat basah, berat kering, dan kadar klorofil planlet pada pengamatan terakhir (42 HSI).

3.6. Batasan Variabel dan Cara Pengamatan

Variabel pengamatan penelitian ini dilakukan secara kuantitatif dan kualitatif. Parameter kuantitatif dilakukan untuk mengetahui pertumbuhan eksplan kentang dengan parameter pengamatan berupa:

1. Waktu muncul tunas (hst),

Waktu yang dibutuhkan untuk melihat respon tanaman dalam menghasilkan tunas baru dari batang yang disubkultur dan mengalami multiplikasi. Pengamatan setiap hari hingga muncul tunas.

2. Tinggi planlet (cm)

Tinggi tunas diukur menggunakan kertas millimeter blok dengan satuan sentimeter (cm) diukur dari titik tumbuh sampai ujung daun dari tunas terpanjang. Pengamatan dilakukan seminggu sekali.

3. Jumlah daun plantlet (helai)

Jumlah daun dilakukan secara visual dengan menghitung keseluruhan helai daun pada eksplan kentang. Pengamatan dilakukan seminggu sekali hingga berakhirnya penelitian.

4. Jumlah akar

Jumlah akar yang terbentuk adalah akar yang muncul dari tiap tunas yang tumbuh pada media perlakuan. Jumlah akar diamati seminggu sekali.

5. Jumlah ruas batang

Jumlah ruas yang terbentuk adalah menghitung jumlah ruas primer dan sekunder yang muncul dari tiap batang yang tumbuh. Jumlah ruas diamati seminggu sekali.

6. Jumlah umbi

Pengamatan terhadap jumlah umbi dilakukan dengan menghitung umbi yang terbentuk pada planlet baik berukuran besar maupun kecil, pengamatan dilakukan pada akhir penelitian.

7. Berat basah dan berat kering planlet (mg/planlet)

Pengamatan berat basah dan berat kering planlet dilakukan setelah 42 HSI. Planlet diambil dan ditimbang menggunakan timbangan digital dalam satu sampel botol yang terdiri dari 5 planlet yang dimasukkan dalam kertas amplop coklat kecil. Berat kering didapatkan setelah amplop berisi planlet dikeringkan dalam oven udara panas pada suhu 60°C hingga 48 jam untuk pemerkiraan berat kering (Sajid dan Aftab, 2009). Perhitungan rerata berat basah dan berat kering tanaman dengan cara mengurangi masing-masing nilai dengan berat kertas dan membagi 5 setiap sampel botol.

8. Kandungan klorofil daun (ppm)

Penentuan kadar klorofil berdasarkan metode laboratorium Bioteknologi UMM (2010). Planlet diambil kemudian dipotong-potong kecil. Potongan daun tersebut kemudian ditimbang sampai berat mencapai 0,1 gram. Sampel daun kemudian digerus dengan menggunakan mortar, kemudian potongan daun yang telah digerus dilarutkan dengan menggunakan aseton 85% sebanyak 5 ml. Dibiarkan selama minimal 4 jam. Ekstrak kemudian disentrifuge selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Fase cair (supernatant) sebanyak 0,5 ml diambil kemudian dipindahkan ke dalam kuvet spektrofotometer. Pengukuran nilai absorbansi hasil ekstrak tersebut dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 663 μm dan panjang gelombang 646 μm . Kemudian data yang diperoleh dicari nilai klorofil a, klorofil b, dan total klorofil yang terdapat dalam larutan uji menggunakan rumus:

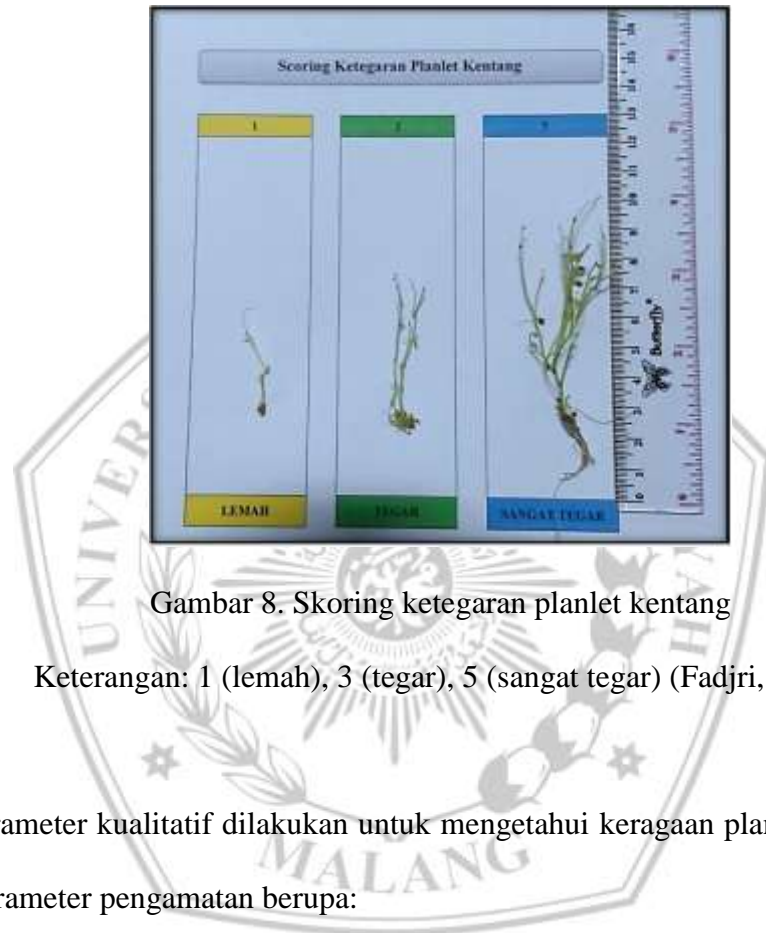
$$\text{Klorofil a (ppm)} = 12,21 \lambda (663 \text{ nm}) - 2,81 \lambda (646 \text{ nm})$$

$$\text{Klorofil b (ppm)} = 20,13 \lambda (646 \text{ nm}) - 5,03 \lambda (663 \text{ nm})$$

$$\text{Klorofil total (pm)} = 17,3 \lambda (646 \text{ nm}) + 7,18 \lambda (663 \text{ nm})$$

9. Scoring Ketegaran Planlet Kentang

Dihitung berdasarkan scoring sebagai berikut (Gambar 8):



Gambar 8. Scoring ketegaran planlet kentang

Keterangan: 1 (lemah), 3 (tegar), 5 (sangat tegar) (Fadjri, 2016)

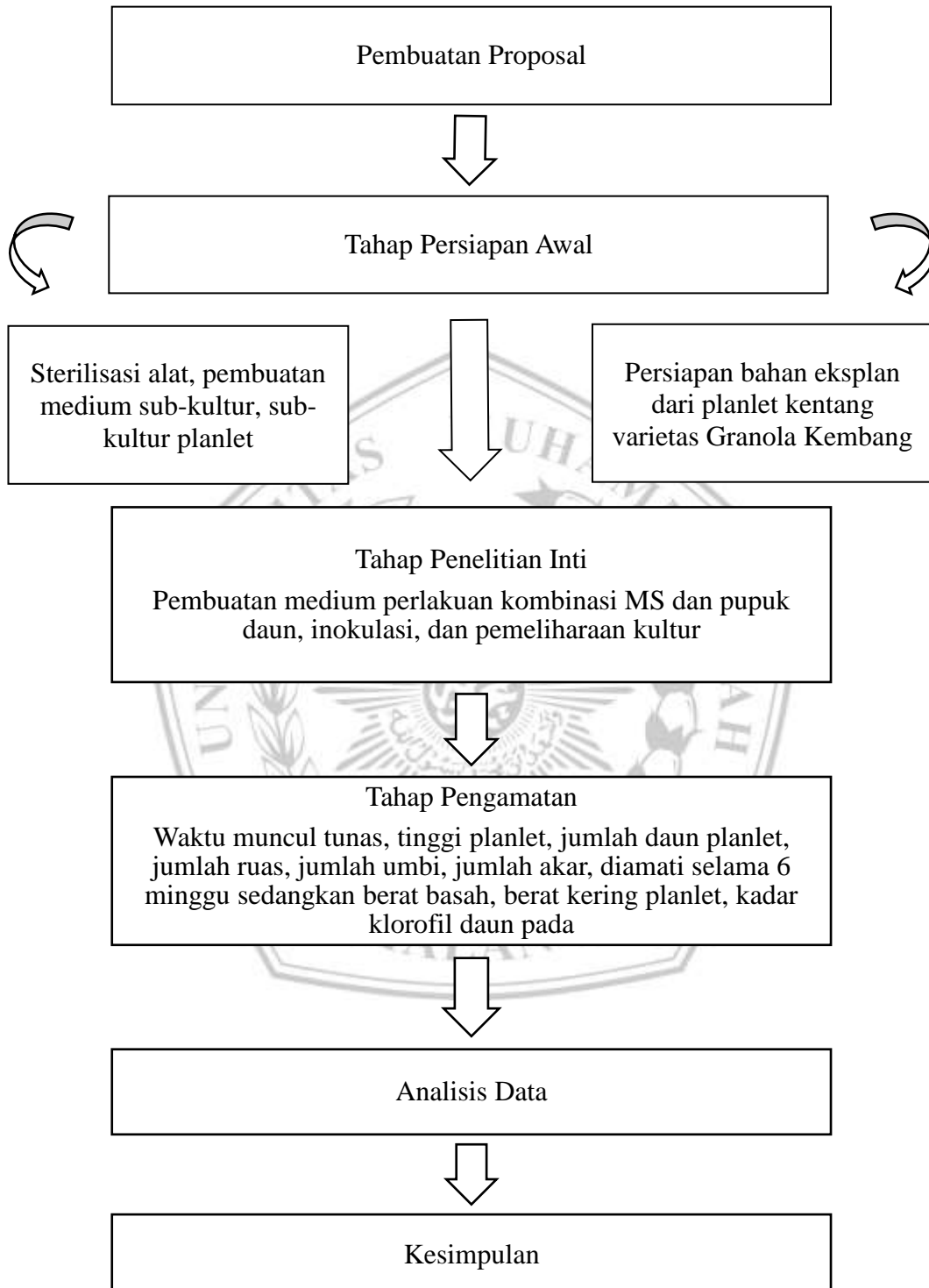
Parameter kualitatif dilakukan untuk mengetahui keragaan planlet kentang dengan parameter pengamatan berupa:

1. Perkembangan tanaman

Pengamatan secara visual melalui dokumentasi sampel setiap perlakuan.

Pengambilan dokumentasi dilakukan setiap dua minggu sekali.

3.6.1. Alur Penelitian



Gambar 9. Alur penelitian